



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**

N. BO2002 A 000564



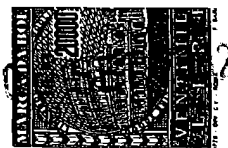
*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

Roma, li

4 GIU. 2003

per IL DIRIGENTE

■ Dr. Massimo Riergallini



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione ALFA WASSERMANN S.p.A. N.G. SP
 Residenza Alarno Scalo (PE) codice 01189820689
 2) Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome _____ cod. fiscale _____
 denominazione studio di appartenenza _____
 via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario ALFA WASSERMANN S.p.A.

via Ragazzi del '99 n. 05 città Bologna cap 40133 (prov) BO

D. TITOLO

classe proposta (sez/c/sci) _____

gruppo/sottogruppo _____

BIFIDOBATTERI E PREPARAZIONI CHE LI CONTENGONO.ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☐

SE ISTANZA: DATA _____

N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) VISCOMI GIUSEPPE CLAUDIO 3) MORELLI LORENZO
 2) ROTINI LEONE GABRIELE 4) FERRARI PATRIZIO

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

1) _____
 2) _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM LMG - COLLECTION, UNIVERSITEIT GENT - GENT (BELGIUM)

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 2 PROV n. pag. 17 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
 Doc. 2) 1 PROV n. tav. _____ disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
 Doc. 3) 1 RIS lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale
 Doc. 4) 10 _____ designazione inventore
 Doc. 5) 1 RIS documenti di priorità con traduzione in italiano
 Doc. 6) 1 RIS autorizzazione o atto di cessione
 Doc. 7) 1 nominativo completo del richiedente

SCIOGLIMENTO RISERVE
 Data _____ N° Protocollo _____
 confronto singole priorità

8) attestati di versamento, totale EURO 188.51

obbligatorio

COMPILATO IL 06/09/2002 FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I) ALFA WASSERMANN S.p.A. (Direttore Generale)CONTINUA S/NO SI Dr. Giampaolo GirottiDEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA S/NO SIUFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI CAMERA DI COMMERCIO I.A.A. DI BOLOGNAcodice 37

VERBALE DI DEPOSITO

DUEMILADUEBO2002A 0 0 0 5 6 4

Reg. A

L'anno millenovecento _____

il giorno _____

SEI

del mese di

SETTEMBREIl (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredate di n. 1 fogli aggluntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

NESSUNA

IL DEPOSITANTE

Raffaello Iottitimbro
dell'ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE

FOGLIO AGGIUNTIVO n. 01

di totali

01

DOMANDA N.

REG. A

A. RICHIEDENTE (I)

B02002A 0 0 0 5 6 4

N.º

<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		codice

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

05	PANTALEO MARIA ROSARIA	

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R	SCIOGLIMENTO RISERVE	
					Data	N° Protocollo

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I) ALFA WASSERMANN S.p.A. (Direttore Generale)

Dr. Giampaolo Girotti

Giampaolo Girotti

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

*Alfa Wassermann*

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA **B02002A 0 0 0 5 5 4**

REG. A

DATA DI DEPOSITO **0 6 SET. 2002**

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

A. RICHIEDENTE (II)

Denominazione **ALFA WASSERMANN S.p.A.**Residenza **Alanno Scalo (PE)**

D. TITOLO

BIFIDOBATTERI E PREPARAZIONI CHE LI CONTENGONO.

Classe proposta (sez./cl./scl.)

(gruppo/sottogruppo)

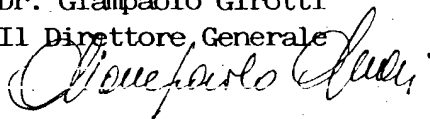
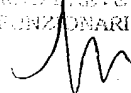
L. RIASSUNTO

La presente invenzione riguarda colture biologicamente pure di due ceppi di *Bifidobacterium longum* denominati W11 e W11a e depositati presso la Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) che li ha registrati con i numeri di accesso LMG P-21586 e LMG P-21587, il loro uso come probiotici in preparazioni di tipo farmaceutico od alimentare e le preparazioni di tipo farmaceutico od alimentare che le contengono utili nel favorire la salute gastrointestinale e nella prevenzione e nel trattamento delle patologie intestinali.

ALFA WASSERMANN S.p.A.

Dr. Giampaolo Girotti

Il Direttore Generale

CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
AGRICOLTURA E PESCA
DI ROMA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

M. DISEGNO

Descrizione dell'Invenzione Industriale dal titolo:

"BIFIDOBATTERI E PREPARAZIONI CHE LI CONTENGONO."

a nome: ALFA WASSERMANN S.p.A.

Contrada Sant'Emidio s.n.c.

65020 Alanno Scalo (Pescara)

Inventori designati: 1) Giuseppe Claudio Viscomi 2) Leone Gabriele Rotini
3) Lorenzo Morelli 4) Patrizio Ferrari
5) Maria Rosaria Pantaleo

Dep. il 06 SET. 2002 No. B02002A 0 0 0 5 6 4

RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda colture biologicamente pure di due ceppi di *Bifidobacterium longum* denominati W11 e W11a e depositati presso la Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) che li ha registrati con i numeri di accesso LMG P-21586 e LMG P-21587, il loro uso come probiotici in preparazioni di tipo farmaceutico od alimentare e le preparazioni di tipo farmaceutico od alimentare che le contengono utili nel favorire la salute gastrointestinale e nella prevenzione e nel trattamento delle patologie intestinali.

AMBITO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda l'uso di microrganismi non patogeni del genere *Bifidobacterium Longum* per favorire la salute gastrointestinale e in particolare per

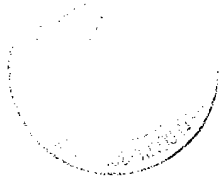
la prevenzione e/o il trattamento dei disturbi dell'apparato digestivo, più in particolare dell'intestino.

Sono noti da molto tempo vari generi di batteri utilizzati come agenti fermentanti per preservare i generi alimentari o per preparare dal latte cibi come yogurt o altri prodotti caseari; questi batteri vengono chiamati con il termine generale di "lactic acid bacteria" e comprendono numerosi generi tra cui Lactococcus, Lactobacillus, Streptococcus, Bifidobacterium e Pediococcus.

Più recentemente, questi batteri sono diventati oggetto di maggiore attenzione perché, quando ingeriti, hanno mostrato importanti proprietà sull'uomo e sugli animali; in particolare ceppi di Lactobacillus o Bifidobacterium, talora somministrati in combinazione fra loro, si sono rivelati efficaci nel colonizzare la mucosa intestinale e nel contribuire alla buona salute dell'individuo, prevenendo la colonizzazione da parte di altri microrganismi dannosi, come riportato nei brevetti US 5,494,664 e US 6,241,983 e nelle domande di brevetto internazionali WO 0033854 e WO 0110453.

Questi microrganismi vengono anche designati con il termine "probiotici" ed un requisito fondamentale per il loro effetto benefico è che raggiungano la mucosa intestinale in un numero e con una vitalità tali da potere persistere e colonizzare l'intestino, quindi è necessario che siano adeguatamente resistenti al basso pH dello stomaco.

L'assunzione di prodotti probiotici è consigliata in caso di disturbi intestinali, come costipazione o diarrea e dopo periodi di trattamento con antibiotici, in particolare cioè in tutti quei casi che portano ad un impoverimento della flora batterica intestinale ed anche in tutti quei casi in cui una alimentazione povera di fibre, condizioni ambientali, o stress riducono la vitalità della flora batterica intestinale.



L'obiettivo di tale somministrazione è di ripristinare adeguati livelli di microrganismi naturalmente presenti nella flora batterica umana mediante l'uso di ceppi batterici ben caratterizzati ed estratti dalla flora di individui sani.

L'attività di colonizzazione di microrganismi esogeni nell'intestino dipende dalla loro concentrazione, dalla loro capacità a colonizzare e dalle condizioni ambientali che incontrano nell'intestino, in quanto una maggiore quantità assunta, un'alta capacità a colonizzare e condizioni ambientali idonee favoriscono il suo effetto protettivo e curativo tramite la colonizzazione di grandi proporzioni nell'intestino senza peraltro avere effetti dannosi trattandosi di prodotti di origine naturale. In particolare è da sottolineare che l'eventuale presenza di fibre alimentari, quali ad esempio l'inulina o i frutto-oligosaccaridi, favorisce particolarmente la colonizzazione in quanto questi composti costituiscono un substrato per il probiotico e quindi aumentano la probabilità di colonizzazione. Per questa loro azione sinergica con il probiotico detti oligosaccaridi sono stati denominati anche "prebiotici".

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

L'oggetto della presente invenzione è costituito da colture biologicamente pure di due ceppi di *Bifidobacterium longum* denominati W11 e W11a e depositati presso la Belgian Coordinated Collections of Microorganisms – BCCM LMG-Collection che li ha registrati con i numeri di accesso LMG P-21586 (sigla di laboratorio W-11) e LMG P-21587 (sigla di laboratorio W-11a), dal loro uso come probiotici in preparazioni di tipo farmaceutico od alimentare e dalle preparazioni di tipo farmaceutico od alimentare che le contengono utili nel favorire la salute gastrointestinale e nella prevenzione e nel trattamento delle patologie intestinali.

I due ceppi di *Bifidobacterium longum* W11 e W11a sono stati isolati dalla flora batterica intestinale naturale di un individuo sano e sono stati selezionati tra numerosi altri ceppi di *Bifidobacterium longum* isolati contemporaneamente perché hanno mostrato una capacità colonizzante sulla flora batterica intestinale ed una capacità di adesione alle cellule intestinali, caratteristiche entrambe che ne fanno ottimi agenti probiotici capaci di favorire la buona salute del tratto gastrointestinale e di ripristinarne la funzionalità alterata dalle gastroenteriti di varia origine.


Le colture batteriche oggetto della presente invenzione sono state prodotte prima in laboratorio e quindi in preparazioni industriali e sono costituite da ceppi puri che sono stati cresciuti a 37°C per 20 ore in un opportuno mezzo di coltura denominato TPY contenente come ingredienti principali peptone triptico di caseina, peptone di soia, estratto di lievito e glucosio oltre a sali di potassio, calcio, magnesio e zinco.

Da queste colture primarie sono state preparate delle successive sub-colture allo scopo di aumentare il numero di cellule dei ceppi puri fino ad ottenere le colture madri che sono servite come inoculo per la produzione industriale delle colture batteriche dei due probiotici *Bifidobacterium longum* W11 e W11a.

Il processo di produzione industriale di dette colture batteriche prevede le seguenti fasi:

1. fermentazione a un pH controllato compreso tra 5,5 e 7,5;
2. separazione della biomassa batterica dal brodo colturale mediante centrifugazione;
3. liofilizzazione della biomassa batterica, dopo aggiunta di opportuni crioprotettori scelti tra protidi, carboidrati e sali minerali per salvaguardare la vitalità cellulare durante la fase di congelamento e liofilizzazione, eventualmente anche con l'aggiunta di un precipitato proteico con lo scopo di





aumentare la resistenza del ceppo alla degradazione enzimatica ed a condizioni di pH acido;

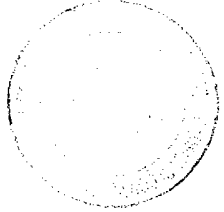
4. macinazione e granulazione della coltura liofilizzata.

Il prodotto così preparato contiene mediamente da circa 1×10^{10} a 1×10^{12} cellule vive di *Bifidobacterium longum* W11 o W11a per grammo di prodotto finale, analizzato secondo metodi microbiologici di conta batterica noti ad un esperto dello stato dell'arte, quali ad esempio quelli riportati in Ison A. P. and Matthew G. B., Applied Microbial Physiology a practical approach, Rhodes P. M. and Stanbury P.F. Editors - IRL Press Oxford, 103-130, 1997.

Le colture batteriche sono state testate in prove di colonizzazione dell'intestino di topi con risultati positivi in quanto la conta della quantità di carica batterica di *Bifidobacterium longum* LMG P-21586 o LMG P-21587 ha evidenziato un valore superiore a 1×10^6 cellule vive per grammo di feci di topo.

Ulteriore oggetto della presente invenzione, strettamente derivante dall'oggetto principale, è costituito dall'uso delle colture biologicamente pure ottenute dai ceppi di *Bifidobacterium longum* W11 o W11a come probiotici in preparazioni di tipo farmaceutico od alimentare utili nel favorire la salute gastrointestinale e nella prevenzione e nel trattamento delle patologie intestinali quali diarree, gastroenteriti di varia origine, stipsi, colon irritabile, malattia diverticolare e malattie infiammatorie croniche dell'intestino.

L'efficacia delle colture batteriche contenenti il *Bifidobacterium longum* W11 o W11a nel favorire la salute gastrointestinale può essere aumentata aggiungendo alle preparazioni di tipo farmaceutico od alimentare che le contengono delle fibre alimentari sotto forma di oligosaccaridi non digeribili, ad esempio frutto-oligosaccaridi od inulina, che non vengono assorbiti né idrolizzati nel primo tratto

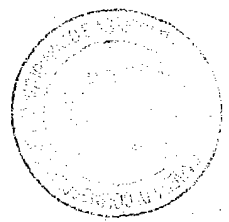


dell'intestino e potenziano l'attività e stimolano il metabolismo dei ceppi di *Bifidobacterium longum* LMG P-21586, e LMG P-21587 a svantaggio dei batteri patogeni. Gli oligosaccaridi preferiti nell'attuazione della presente invenzione sono miscele di frutto-oligosaccaridi composti da un'unità di base formata da una molecola di glucosio (G) unita ad una catena di molecole di fruttosio (F) di formula generale GF_n , con $n \leq 4$, aventi un grado di polimerizzazione, cioè un numero di unità monosaccaridiche, compreso tra 2 e 20. I frutto-oligosaccaridi che vengono usati come prebiotici in associazione ai due tipi di probiotici oggetto della presente invenzione hanno un grado di polimerizzazione compreso tra 2 e 10, preferibilmente tra 3 e 6.

Le preparazioni oggetto della presente invenzione possono contenere, insieme ad eccipienti vari come dolcificanti, ad esempio aspartame, mannitolo o sorbitolo, aromatizzanti e coloranti, vitamine, preferibilmente vitamine dei gruppi E, B1, B2, B6 e B12, che hanno lo scopo di favorire ulteriormente la salute ripristinando la componente vitaminica che subisce una forte riduzione durante le patologie del tratto intestinale.

Oggetto della presente invenzione sono sia preparazioni farmaceutiche che prodotti alimentari contenenti colture batteriche di *Bifidobacterium longum* denominati W11 e W11a e registrati con i numeri di accesso LMG P-21586 o LMG P-21587, opzionalmente in associazione con prebiotici, preferibilmente frutto-oligosaccaridi o inulina, e/o con vitamine, preferibilmente vitamine dei gruppi E, B1, B2, B6 e B12.

Le preparazioni farmaceutiche sono costituite preferibilmente da composizioni somministrabili per via orale sotto forma di capsule, compresse, bustine, tavolette, sospensioni liquide, supplementi orali secchi, supplementi orali liquidi, fiale ed altre



ancora contenenti una carica batterica di cellule vive di *Bifidobacterium longum* W11 o W11a alla fine del periodo di stabilità compresa tra 1×10^7 ed 1×10^{11} .

Le suddette preparazioni farmaceutiche possono contenere anche agenti prebiotici come i frutto-oligosaccaridi o l'inulina, preferibilmente da 0,5 a 5g di frutto-oligosaccaride per dose, ancor più preferibilmente da 1 a 3g, e/o vitamine, preferibilmente vitamine dei gruppi E, B1, B2, B6 e B 12.

Quantità di probiotico da 1×10^7 a 1×10^{11} di cellule vive di *Bifidobacterium longum* possono essere incorporate anche nella produzione di svariati tipi di prodotti alimentari quali latte, yogurt, formaggi freschi come ricotta, stracchino e mozzarella, gelati, prodotti a base di latte fermentato, prodotti a base di cereali fermentati, polveri a base di latte, prodotti per l'infanzia e prodotti per animali domestici.

I test di verifica della conta batterica hanno evidenziato come entrambi i ceppi di *Bifidobacterium longum* oggetto della presente invenzione siano resistenti tanto da non subire mortalità rilevante né durante i processi tecnologici di produzione delle preparazioni farmaceutiche od alimentari, né durante il normale periodo di stoccaggio degli stessi. Infatti queste preparazioni batteriche sono state sottoposte a prove di stabilità che hanno dimostrato una ottima resistenza dei due ceppi batterici a temperatura ambiente tale da permetterne la loro commercializzazione per un periodo non inferiore a 2 anni da quando vengono prodotti.

Gli esempi di seguito riportati servono ad illustrare ulteriormente l'invenzione e non devono essere considerati come una limitazione alla medesima.

ESEMPIO 1

METODO DI PRODUZIONE DELLA CULTURA BATTERICA DEL CEPPO DI *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* W11

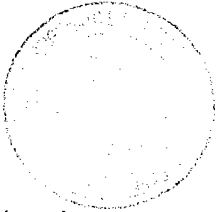
La “coltura primaria” del ceppo di *Bifidobacterium longum* W11 utilizzata come inoculo nelle fermentazioni industriali corrisponde esattamente a quella depositata presso la Belgian Coordinated Collections of Microorganisms – BCCM LMG-Collection - Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, la quale in sede di accettazione del ceppo inviato ha confermato la purezza e vitalità del ceppo e lo ha registrato con il numero di accesso LMG P-21586.

Per ottenere questa “coltura primaria”, il ceppo suddetto è stato cresciuto in un terreno di coltura denominato TPY avente la seguente composizione riportata ad un litro:

- Peptone triptico di caseina	g	10
- Peptone di soia	g	5
- Estratto di lievito	g	5
- Glucosio	g	10
- K_2HPO_4 anidro	g	2
- $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	g	0,5
- $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	g	0,25
- $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	g	0,15
- Tween 80	ml	1
- Cisteina cloridrato	g	0,5
- Acqua bidistillata	q. b. a ml	1000



A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'S' followed by a horizontal line.



La crescita è stata effettuata a 37 °C per 20 ore quindi la coltura è stata ripartita, con l'aggiunta di opportuni crioprotettori scelti tra protidi, carboidrati e sali minerali, in fiale che sono state congelate e stoccate in azoto liquido a -196 °C.

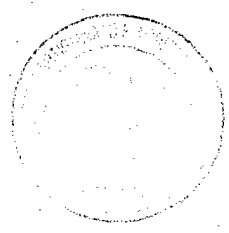
A partire dalla "coltura primaria", con una percentuale di inoculo del 3%, sono state preparate 3 sub-culture con lo scopo di espandere il numero di cellule del ceppo batterico.

L'ultima sub-cultura di circa 10 litri, denominata "coltura madre", è servita ad inoculare il reattore della "coltura intermedia" con capacità di circa 300 litri.

Il successivo processo di produzione industriale della coltura biologicamente pura di *Bifidobacterium longum* W11 comprende le seguenti fasi:

1. fermentazione a pH controllato tra 6,5 e 7,0;
2. separazione della biomassa batterica dal brodo colturale;
3. protezione della biomassa batterica con soluzione di crioprotettori scelti tra protidi, carboidrati e sali minerali allo scopo di salvaguardare la vitalità cellulare durante le successive fasi di congelamento e liofilizzazione, e eventualmente anche mediante inclusione in un precipitato proteico con lo scopo anche di conferire una resistenza del ceppo alla degradazione enzimatica e a condizioni di pH acido;
4. liofilizzazione;
5. macinazione e granulazione della coltura liofilizzata;
6. miscelazione della coltura liofilizzata;
7. confezionamento.

Il prodotto ottenuto contiene circa $8 - 10 \times 10^{10}$ cellule vitali per grammo.



ESEMPIO 2

METODO DI PRODUZIONE DELLA COLTURA BATTERICA DEL CEPPLO DI *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* W11a

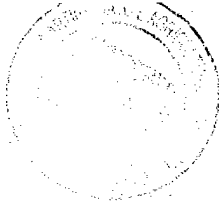
Utilizzando la metodica descritta nell'esempio 1 è stata preparata la coltura batterica biologicamente pura del *Bifidobacterium longum* W11a partendo da una "coltura primaria" del ceppo di *Bifidobacterium longum* esattamente corrispondente a quella depositata presso la Belgian Coordinated Collections of Microorganisms – BCCM LMG-Collection - Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent che ha confermato la purezza e vitalità del ceppo e lo ha registrato con il numero di accesso LMG P-21587.

ESEMPIO 3

PROVE DI COLONIZZAZIONE IN VIVO

I test sono stati condotti su 4 gruppi di 2 topi, ciascun topo ha ricevuto due dosi, a distanza di 16 ore l'una dall'altra, di una soluzione glucosata contenente una concentrazione di *Bifidobacterium longum* LMG P-21586 pari a $1,6 \times 10^9$ CFU/60 µl.

L'abilità del ceppo nella colonizzazione nell'intestino di questi topi è stata determinata mediante misura della quantità di *Bifidobacterium longum* presente nelle feci: il primo campionamento è stato effettuato prima dell'inizio delle somministrazioni, mentre i successivi campionamenti sono stati fatti rispettivamente a 2, 4, 8, 24, 48 ore dopo la seconda somministrazione. La quantità del ceppo di *Bifidobacterium longum* determinata nelle feci è risultata dell'ordine di 10^6 CFU/g, dando così l'evidenza dell'avvenuta colonizzazione. In particolare è stato riscontrato che rispetto a tutti i ceppi di bifidobatteri riscontrati nelle feci, il




Bifidobacterium longum è risultato essere il principale componente della flora batterica.

ESEMPIO 4

FORMULAZIONE IN BUSTINE IN ASSOCIAZIONE CON FRUTTO-OLIGOSACCARIDI E VITAMINE

A titolo di esempio viene riportata la preparazione di bustine da 3 g l'una da sciogliere in acqua o latte contenenti ognuna 250 mg di coltura batterica biologicamente pura corrispondenti a circa 2×10^{10} cellule vive di *Bifidobacterium longum* W11, 2500 mg di frutto-oligosaccaridi e vitamine dei gruppi B1, B2, B6 e B12.

In particolare, come frutto-oligosaccaride è stato usato il prodotto commercialmente disponibile denominato Actilight ® 950P che è costituito da una miscela di frutto-oligosaccaridi composti da una catena di molecole di fruttosio unita a una molecola di glucosio di formula generale GF_n con $n \leq 4$ e con un grado di polimerizzazione compreso tra 2 e 10.



In dettaglio la composizione quali-quantitativa delle bustine è la seguente:

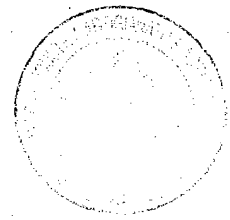
Componente	Mg
Bifidobacterium longum W11	250
Actilight ® 950P	2500
Vitamina B1	1,4
Vitamina B2	1,6
Vitamina B6	2
Vitamina B12	0,001
Aroma Mandarino	20
Aspartame	20
Silice colloidale	10
Sorbitolo	195



Metodica di preparazione

Viene effettuata una prima fase di miscelazione delle vitamine con una parte aliquota di Actilight ® 950P seguita da setacciatura su rete con luce netta da 0,5 mm. Questa prima miscela viene addizionata di una seconda parte aliquota di Actilight ® 950P e si procede ad una nuova fase di miscelazione. Infine viene effettuata l'aggiunta della coltura batterica di *Bifidobacterium longum* W11, della restante quota di Actilight ® 950P e degli altri componenti previsti in formula con una ulteriore fase di miscelazione seguita da una setacciatura finale su rete da 0,8 mm.

Il prodotto viene quindi ripartito in bustine di alluminio al peso di 3 g. Il processo tecnologico di preparazione delle bustine non determina alcun danneggiamento della vitalità del ceppo.



Prove di stabilità

Le prove di stabilità sono state condotte sulle bustine misurando la carica batterica al tempo zero e dopo rispettivamente 1, 2, 3 mesi di stoccaggio a 22° C e determinando così il tempo di emivita. L'analisi dei dati dopo 1,2,3 mesi ha evidenziato che la mortalità in questi intervalli di tempo è stata molto contenuta, per cui con la formulazione in bustina sopra riportata risulta che dopo circa 2 anni si ha un numero di cellule vive per dose non inferiore a 5×10^9 cellule. Tale risultato evidenzia come questa preparazione sia del tutto adeguata per gli scopi che la presente invenzione intende ottenere.

ESEMPIO 5

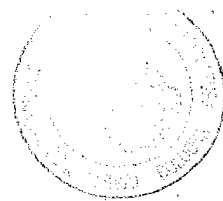
FORMULAZIONE IN CAPSULE SOFT GEL IN ASSOCIAZIONE CON VITAMINE

Capsule soft gel della seguente composizione quali-quantitativa:

Componente	mg
Bifidobacterium longum W11	125
Mono e digliceridi degli acidi grassi	14
Olio di soia	261,372
Lecitina di soia	5
Tocoferoli naturali (E)	16,418
Tiammina mononitrato (B1)	2,072
Piridossina cloridrato (B6)	2,918
Riboflavina (B2)	1,920
Cianocobalamina 0,1% (B12)	1,300
Gelatina alimentare	116
Glicerolo	71
Titanio biossido	4,140
Ferro ossido giallo	0,200

sono state preparate facendo una sospensione omogenea della coltura batterica di *Bifidobacterium longum* W11, delle vitamine, della lecitina di soia e dei mono e digliceridi degli acidi grassi in olio di soia, ripartendo la suddetta sospensione in capsule del formato 7,5 ovale costituite da gelatina alimentare, glicerolo, biossido di titanio e ferro ossido giallo ed infine essiccando con flusso di aria a temperatura di circa 21°C e con circa il 20% di umidità.





RIVENDICAZIONI

1. Una coltura biologicamente pura costituita dal ceppo di *Bifidobacterium longum* LMG P-21586.
2. Una coltura biologicamente pura costituita dal ceppo di *Bifidobacterium longum* LMG P-21587.
3. Uso delle colture biologicamente pure secondo ciascuna delle rivendicazioni 1 e 2 come probiotici in preparazioni di tipo farmaceutico od alimentare per favorire la salute gastrointestinale e per prevenire e trattare le patologie intestinali.
4. Preparazioni di tipo farmaceutico od alimentare contenenti una carica batterica compresa tra 1×10^7 e 1×10^{11} di cellule vive provenienti da una coltura biologicamente pura costituita dal ceppo di *Bifidobacterium longum* LMG P-21586.
5. Preparazioni di tipo farmaceutico od alimentare contenenti una carica batterica compresa tra 1×10^7 e 1×10^{11} di cellule vive provenienti da una coltura biologicamente pura costituita dal ceppo di *Bifidobacterium longum* LMG P-21587.
6. Preparazioni secondo ciascuna delle rivendicazioni 4 e 5 caratterizzate dal fatto di contenere un prebiotico sotto forma di oligosaccaridi.
7. Preparazioni secondo la rivendicazione 6 caratterizzate dal fatto che gli oligosaccaridi sono dei frutto-oligosaccaridi con un grado di polimerizzazione compreso tra 2 e 10 o inulina.
8. Preparazioni secondo ciascuna delle rivendicazioni da 4 a 7 caratterizzate dal fatto di contenere vitamine.

9. Preparazioni secondo la rivendicazione 8 caratterizzate dal fatto che le vitamine sono le vitamine E, B1, B2, B6 e B12.
10. Preparazioni secondo ciascuna delle rivendicazioni da 4 a 9 caratterizzate dal fatto che sono scelte tra capsule, compresse, bustine, tavolette, sospensioni liquide, supplementi orali secchi, supplementi orali liquidi, fiale, latte, yogurt, formaggi freschi, gelati, prodotti a base di cereali fermentati, polveri a base di latte, prodotti per l'infanzia e prodotti per animali domestici.



ALFA WASSERMANN S.p.A.

(Il Direttore Generale)

Dr. Giampaolo Girotti

Giampaolo Girotti



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
AGRICOLTURA e ARTIGIANATO
UFFICIO ABBONAMENTI
IL FUNZIONARIO

[Signature]

